

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/86, A61K 48/00, C12N 5/10	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/28488 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 10. Juni 1999 (10.06.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE98/03542 (22) Internationales Anmeldedatum: 27. November 1998 (27.11.98) (30) Prioritätsdaten: 197 52 855.4 28. November 1997 (28.11.97) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND, letztvertreten durch den PRÄSIDENTEN DES PAUL-EHRLICH-INSTITUTS [DE/DE]; R. Kurth, Paul-Ehrlich-Strasse 51-59, D-63225 Langen (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): CICHUTEK, Klaus [DE/DE]; Großer Hasenpfad 114, D-60598 Frankfurt am Main (DE). MERGET-MILLITZER, Heike [DE/DE]; Einhardstrasse 46, D-65300 Seligenstadt (DE). (74) Anwälte: VOSSIUS, Volker usw.; Holbeinstrasse 5, D-81679 München (DE).	(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
(54) Title: PSEUDO-TYPE RETROVIRAL VECTORS WITH MODIFIABLE SURFACE CAPSID PROTEINS (54) Bezeichnung: RETROVIRALE PSEUDOTYP-VEKTOREN MIT MODIFIZIERTEN OBERFLÄCHEN-HÜLLPROTEINEN UND VERFAHREN ZU IHRER HERSTELLUNG FÜR DEN SELEKTIVEN GENTRANSFER (57) Abstract <p>The invention relates to pseudo-type retroviral vectors with modified surface capsid proteins which are suitable for cell-specific transduction of a selected mammal cell type (cell targeting). The invention also relates to a method for the production of cell-specific pseudo-type retroviral vectors and to the use thereof in gene transfers in selected cells.</p> (57) Zusammenfassung <p>Die Erfindung betrifft pseudotypisierte retrovirale Vektoren mit modifizierten Oberflächen-Hüllproteinen, die für die zellspezifische Transduktion eines ausgewählten Säugerzelltyps geeignet sind (Zelltargeting), Verfahren zur Herstellung der zellspezifischen pseudotypisierten retroviralen Vektoren und ihre Verwendung zur Genübertragung in ausgewählte Zellen.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Retrovirale Pseudotyp-Vektoren mit modifizierten Oberflächen- Hüllproteinen und Verfahren zu ihrer Herstellung für den selektiven Gentransfer

5

10

Die Erfindung betrifft retrovirale Pseudotyp-Vektoren mit modifizierten Oberflächen-Hüllproteinen, die für die zellspezifische Transduktion eines ausgewählten Säugerzelltyps geeignet sind (Zelltargeting), Verfahren zur Herstellung der zellspezifischen retroviralen Pseudotyp-Vektoren und ihre Verwendung zur Genübertragung in ausgewählte Zellen.

15

20

25

30

Ziel der somatischen Gentherapie soll der effektive Transfer von Genen oder Gen-Fragmenten sein, die funktionelle Homologie zu einem defekten Gen aufweisen, oder von Genen oder Gen-Fragmenten mit therapeutischer Wirkung. Bisherige Versuche und klinische Studien zur somatischen Gentherapie wurden überwiegend auf Basis der retroviralen Murinen Leukämieviren (MLV) durchgeführt. Der Wirtszellbereich retroviraler Vektoren wird durch das Oberflächen-Hüllprotein (SU) bestimmt, das vom *env*-Gen codiert wird. Die Proteinprodukte des *env*-Gens bilden die äußere Hülle des retroviralen Vektors. Die SU-Proteine interagieren mit, d.h. sie binden an ein bestimmtes Protein (Rezeptor) auf der Oberfläche der Wirtszelle. Die *env*-Genprodukte z.B. des amphotropen MLV erlauben den Gentransfer in eine große Anzahl unterschiedlicher Säugerzellen. Sowohl mittels ecotroper als auch amphotroper MLV-Vektoren werden generell alle murinen (ecotrop) bzw. murine und humane Zellen (amphotrop) transduziert, da die von diesen Viren angesteuerten Rezeptoren ubiquitär vorhanden sind. Ein zellspezifischer Gentransfer mittels MLV ist somit nicht möglich.

Eine Wirtszellspezifität ist z.B. für den gentherapeutischen Einsatz jedoch von Vorteil, da bei einer Gentherapie außerhalb des Organismus (*ex vivo*) (Anderson et al., *Science* 256 (1992), 808-813; Yu et al., *H. Gene Therapy* 8 (1997), 1065-1072) aufwendige Aufreinigungen von Zellen vermieden werden. Für den Therapie-, Diagnostik- oder Impf-Einsatz *in vivo* ist erwünscht, daß die retroviralen Vektoren gezielt die gewünschten Wirtszellen ansteuern, die von genetischen Fehlfunktionen betroffen bzw. Ziel der Therapie sind, und anschließend das therapeutische Gen übertragen.

Eine Einengung des Wirtszellbereichs z.B. des amphotropen MLV konnte durch Modifikation des Oberflächenhüllproteins erreicht werden. Eine Modifikation des Oberflächenhüllproteins wurde durch die Fusion mit einer Hormondomäne durchgeführt. Es fand eine Transduktion der Zellen statt, die den spezifischen Hormonrezeptor trugen (Kasahara *et al.*, *Science* 266 (1994), 1373-1375). Ferner wurde das Oberflächenhüllprotein durch Fusion mit einem einkettigen Antikörperfragment (*single chain variable fragment*, nachfolgend auch "scFv" bezeichnet) modifiziert. Das Fragment repräsentierte die antigenbindende Domäne eines Antikörpers und ist ein Fusionsprotein, das aus den variablen Domänen V_H und V_L eines monoklonalen Antikörpers zusammengesetzt ist. Die beiden Domänen sind über ein Glycin- und Serin-Oligopeptid [-(ser-gly4)3-gly-] verknüpft, das die korrekte Faltung des Fusionsproteins ermöglicht (Huston *et al.*, *Methods Enzymol.* 203 (1991), 46-88; Whitlow *et al.*, *Methods: A companion to Methods Enzymol.* 2 (1991), 97-105). Alle bisher durchgeführten Modifikationen des MLV-Oberflächenhüllproteins mit einem scFv zeigten, daß es zwar zu einer Bindung der Vektoren an die Wirtszelle kam, nicht jedoch zu einem Eintritt in die Zelle (Russel *et al.*, *Nucleic Acid Res.* 21 (1993), 1081-1985). Weiterhin ist bekannt, daß das Oberflächenhüllprotein des MLV generell keine umfangreichen Modifikationen erlaubt (Cosset *et al.*, *J. Virol* 69 (1995), 6314-632). Modifikationen, bei denen ein Teil der Bindungsdomäne des MLV-SU-Proteins ersetzt wurde, führten oft zu einer inkorrekten Prozessierung und somit zu einem defekten Transport des SU-Proteins an die Zelloberfläche (Weiss *et al.*, *In J.A. Levy* (ed.), *The Retroviridae* 2 (1993), 1-108 ; Morgan *et al.*, *J. Virol.* 67 (1993), 4712-4721; Russel *et al.*, *Nucleic Acid Res.* 21 (1993), 1081-1085).

Um die Problematik der nötigen Modifikation des Oberflächenhüllproteins, die zur spezifischen Ansteuerung des gewünschten Zelltyps nötig ist, zu umgehen, wurde die Herstellung wirtszellspezifischer retroviraler Vektoren durch die Pseudotypisierung von z. B. MLV-Kapsiden erreicht. Dabei stammt der Viruskern vom MLV und die Virushülle (SU-Proteine) von anderen retroviralen Vektoren. Vorteile der Pseudotypisierung von MLV-Kapsiden liegen in der Minderung des Risikos der Entstehung von replikationskompetenten Retroviren. Durch Verwendung unterschiedlicher nicht homologer Expressionsplasmide, die für die Strukturgene *gag*, *pol* und *env* kodieren wird die Gefahr der Rekombination vermindert. So konnte gezeigt werden, daß MLV-Kapside mit ENV-Proteinen des Affensarkom assoziierten Virus (Takeuchi *et al.*, *Virology* 186 (1992), 792-794), des Katzen Leukämie Virus (Porter *et al.*,

Hum. Gene Ther. 7 (1996), 913-919) bzw. der endogenen Retroviren der Katzen (Vile et al., *Virology* 180 (1991), 420-424) pseudotypisiert werden können. Reiser et al. (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (1996), 15266-15271) konnten zeigen, daß die Herstellung von HIV/MLV bzw. HIV/VSV-G Pseudotypen möglich ist. Ebenso wurde die mögliche Inkorporation von VSV-G-Protein (Burns et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993), 8033-8037; Ory et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (1996), 11400-11406,) sowie die Inkorporation von trunkierten HIV-env-Glykoproteinen (Schnierle et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997), 8640-8645) in MLV-Kapside beschrieben. Die in dieser Weise pseudotypisierten Vektoren können jedoch nicht jeden beliebigen zellspezifischen Rezeptor eines Zelltyps anzusteuern, da die Zielzelle nur durch den Tropismus (Zellspezifität eines Virus) des jeweiligen Virus-Oberflächenproteins bestimmt wird.

Der Gentransfer in Säugerzellen mittels (pseudotypisierten Retroviren) retroviraler Vektoren hat generell folgende Vorteile:

- Es wird in der Regel eine Kopie des gewünschten Gens in die Säugerzelle überführt.
- Das gewünschte Gen wird im allgemeinen ohne Mutation oder Rearrangements übertragen.
- Es erfolgt ein stabiler Einbau des gewünschten Gens in das Genom der Zielzelle.

Der Gentransfer in Säugerzellen mittels pseudotypisierten Retroviren hat weiterhin den Vorteil, daß mittels Pseudotypisierung von z.B. MLV-, HIV-, Foamyvirus- oder SIV-Kapsiden vor allem mit SNV-ENV-Protein eine gezielte Veränderung der Zellspezifität der jeweiligen retroviralen Vektoren vorgenommen werden kann, so daß z.B. ein therapeutisches Gen in eine ausgewählte Zellpopulation eingeführt werden kann.

Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, retrovirale Pseudotyp-Vektoren mit modifizierten Oberflächen-Hüllproteinen, die für die zellspezifische Transduktion eines ausgewählten Säugerzelltyps geeignet sind (Zelltargeting) bereitzustellen. Der Erfindung liegt ferner die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Herstellung der zellspezifischen retroviralen Pseudotyp-Vektoren bereitzustellen. Der Erfindung liegt ferner die Aufgabe zugrunde, retrovirale Verpackungszellen zur Gewinnung der erfindungsgemäßen Vektoren

bereitzustellen. Mit Hilfe dieser Vektoren gelingt es, im Gegensatz zu den bisher bekannten Vektoren, jeden beliebigen Rezeptor einer Zielzelle anzusteuern.

Die Aufgabe der Erfindung wird durch die erfindungsgemäßen retrovirale Vektoren, umfassend Viruskern von z.B. murinen Leukämievirus (MLV), menschlichen Immunschwächenvirus (HIV), Affen-Immunschwächenvirus (SIV) oder Foamyvirus und Virushüllen vom Milz-Nekrosevirus (SNV) gelöst. Bevorzugt sind retrovirale Vektoren, deren Virushüllen das Vollängen-Oberflächenprotein (SU-Protein) des SNV und/oder ein chimäres SNV-virusfremdes Polypeptid-ENV, SNV-HIV-ENV oder SNV-SIV-ENV umfassen.

5 Besonders bevorzugt sind retrovirale Vektoren, deren virusfremdes Polypeptid ein Ligand, ein Peptidfragment eines Liganden, ein Antikörper, ein Peptidfragment eines Antikörpers oder eine Antikörperererkennungsdomäne (scFv) umfaßt. Ferner bevorzugt sind retrovirale Vektoren, weiter umfassend eine RNA, die in die durch den retroviralen Vektor zu transduzierende Zelle eingeführt werden soll. Besonders bevorzugt sind retrovirale Vektoren, deren RNA ein

10 therapeutisches Gen oder ein Nukleinsäurefragment eines therapeutischen Gens und/oder ein Reportergen umfaßt. Insbesondere bevorzugt sind retrovirale Vektoren, wobei das therapeutische Gen oder das Nukleinsäurefragment eines therapeutischen Gens das CFTR-Gen, phox91, ADA, IL-16, p53, transdominante Mutanten (z.B. revM10) sowie Impfgene z. B. rekombinantes gp120 und IL-16 umfaßt. Weiter besonders bevorzugt sind retrovirale

20 Vektoren, wobei das Reportergen β -Galaktosidase, "Green Fluorescent Protein", Luciferase oder die Resistenzgene Neomycin oder "multiple drug resistance gene" umfaßt. Die erfindungsgemäßen retroviralen Vektoren können als Arzneimittel verwendet werden. Bevorzugt ist die Verwendung zur Herstellung eines Arzneimittels zur somatischen Gentherapie, Impftherapie oder Diagnostik. Besonders bevorzugt ist die Therapie der

25 Cystischen Fibrose, des ADA-Mangels, der chronischen Granulomatose und der HIV-1 Infektion.

Die Aufgabe der Erfindung wird ferner durch die erfindungsgemäßen retroviralen Verpackungszellen zur Gewinnung der erfindungsgemäßen retroviralen Vektoren gelöst. Die

30 erfindungsgemäßen retroviralen Verpackungszellen sind sowohl mit einem oder mehreren psi-negativen Expressionskonstrukt(en), die die gag- und pol-Genprodukte des MLV, HIV, SIV oder Foamyvirus exprimieren als auch mit einem psi-negativen SNV-Env- und/oder psi-negativen SNV-Env-virusfremden Polypeptid-, psi-negativen SNV-HIV-Env- oder SNV-SIV-

- env-Expressionskonstrukt transfiziert. Bevorzugt ist eine retrovirale Verpackungszelle, in der das virusfremde Polypeptid des psi-negativen SNV-Env-virusfremden Polypeptid-Expressionskonstrukts einen Ligand, ein Peptidfragment eines Liganden, einen Antikörper, ein Peptidfragment eines Antikörpers oder eine Antikörpererkennungsdomäne (scFv) umfaßt.
- 5 Ferner bevorzugt ist eine retrovirale Verpackungszelllinie, ferner umfassend ein psi-positives Expressionskonstrukt, umfassend eine Nukleinsäuresequenz, die in die durch den retroviralen Vektor zu transduzierende Zelle eingeführt werden soll. Besonders bevorzugt ist eine retrovirale Verpackungszelllinie, wobei die Nukleinsäuresequenz ein therapeutisches Gen oder dessen Nukleinsäurefragment und/oder ein Reportergen umfaßt. Insbesondere bevorzugt ist
- 10 eine retrovirale Verpackungszelllinie, wobei das therapeutische Gen oder das Nukleinsäurefragment eines therapeutischen Gens das CFTR-Gen, phox91, ADA, IL-16, p53, transdominante Mutanten (z.B. revM10) und Impfgene z. B. rekombinantes gp120 und IL-16 umfaßt. Ferner besonders bevorzugt ist eine retrovirale Verpackungszelllinie, wobei das Reportergen β -Galaktosidase, "Green Flourescent Protein", Luciferase oder die Resistenzgene
- 15 Neomycin oder das "multiple drug resistance gene" umfaßt.

Die Abbildungen dienen der Erläuterung der Erfindung

- Abb.1 zeigt schematisch die Gewinnung eines MLV/SNV-Pseudotyp-Vektors. Die Verpackungszelle TelCeB6 enthält die Konstrukte pCeB und pMFG-InsLacZ. Die Zelle
- 20 exprimiert somit die Strukturgene *gag* und *pol*, sowie das Reportergen β -Galaktosidase. Zur Herstellung eines pseudotysierten Vektors werden die SNV-env-Expressionskonstrukte (siehe Abb. 2) in die Zelle transfiziert. Hiermit werden ebenfalls die Sturkturgene für das wt-env (pIM29; Chu et al., 1997) und die chimären scFv-env (pT-scFv) zur Verfügung gestellt und
- 25 exprimiert. Es werden Vektorpartikel in den Zellkulturüberstand abgegeben, die aus MLV-Kapsiden bestehen und SNV-env-Proteine in die Virushülle inkorporieren. Im MLV-Kapsid ist nur die pMFG-InsLacZ-RNA verpackt, so daß das Genprodukt dieses Reportergens nach erfolgreichem Gentransfer (Transduktion der Zielzellen) nachgewiesen werden kann.
- 30 Abb 2 zeigt schematisch das SNV-wt-env-Gen kodierende Konstrukt pIM29 als auch die chimären SNV-scFv- env-Gen Konstrukte.

Abb.3 zeigt schematisch die Herstellung, Isolierung und Selektion der erfindungsgemäßen Vektoren.

Abb. 4 zeigt die Nukleinsäuresequenz von pTC53.

5

Der hier verwendete Begriff amphotropes Virus bedeutet Infektion und Replikation auf murinen und humanen Zellen, im Gegensatz zu ecotropen Viren, das nur auf murinen Zellen repliziert. Der hier verwendete Begriff retroviraler Vektor bedeutet replikationsdefizientes retrovirales Viruspartikel, das anstelle der retroviralen mRNA eine fremde eingeführte RNA eines Gens, z.B. eines therapeutischen Gens oder dessen Fragment oder eines Reportergens
10 übertragen kann. Der hier verwendete Begriff pseudotypisiert bedeutet, daß der retrovirale Vektor einen Viruskern eines Retrovirus besitzt und die Virushülle von einem anderen Retrovirus stammt. Der hier verwendete Begriff Antikörpererkennungsdomäne (scFv) bedeutet Antigenbindestelle eines Antikörpers, umfassend Vh- und Vl-Kette.

15

Zur Bereitstellung der erfindungsgemäßen pseudotypisierten retroviralen Vektoren wird zunächst ein Expressionsprodukt hergestellt, welche die GAG- und POL-Genprodukte z.B. des MLV, HIV, SIV oder Foamyvirus umfaßt. Das Expressionskonstrukt ist psi-negativ, d.h. das Verpackungssignal psi (ψ) ist deletiert. Somit wird das für die Gene gag und pol kodierende
20 Expressionskonstrukt z.B. pCeB (Cosset et al., *J. Virol* 69 (1995), 6314-632), nicht in die entstehenden retroviralen Vektoren verpackt, so daß ein nicht replikationskompetentes Virus entsteht. Als weitere Komponente dient das env-Gen des SNV. Durch Modifikation des Oberflächen-Hüllproteins (SU-Proteins) z. B. durch Insertion eines Antikörpers, Antikörperfragments, scFv's oder eines Liganden eines Oberflächen-Rezeptors von z.B.
25 humanen Zellen oder anderer virusfremder Polypeptide, kann der ursprüngliche Tropismus von SNV (aviane Zellen) verändert werden. Im Gegensatz zu dem MLV-Oberflächenprotein, das nur mäßige Modifikation (Weiss et al., *In J.A. Levy* (ed.), *The Retroviridae* 2 (1993), 1-108 ; Morgan et al., *J. Virol.* 67 (1993), 4712-4721; Russel et al., *Nucleic Acid Res.* 21 (1993), 1081-1085), kann das gesamte SNV-Oberflächenprotein durch ein virusfremdes Polypeptid
30 ersetzt werden, ohne daß die Prozessierung z.B. eines chimären SNV- scFv-ENV-Proteins beeinträchtigt wird (Martinez und Dornburg, 1994; Chu und Dornburg, *J. Virol.* 71 (1997), 720-725). Die virusfremden Polypeptide, z.B. die scFv-Domänen, im Oberflächen-Hüllprotein vermitteln die Erkennung und die Anbindung an Oberflächenproteine ausgewählter

Zellpopulationen, z.B. von hämatopoietischen Zellen, T-Zellen, Leberzellen, Epithelzellen, Muskelzellen oder Fibroblasten von z.B. Mensch, Maus, Ratte, Schaf oder Rind. Zur effizienten Transduktion der ausgewählten Zellen können neben den modifizierten ENV-Proteinen auch die Wildtyp-SNV-ENV-Proteine in die MLV-Kapside inkorporiert werden. Auch das für das Wildtyp-SNV-ENV-Protein kodierende Plasmid muß psi-negativ sein, damit entsprechende Boten-RNA nicht in die Retroviruspartikel aufgenommen wird. Die erfindungsgemäßen HIV/SNV- bzw. Foamyvirus/SNV-Pseudotypen sind z. B. zum spezifischen Gentransfer in ruhende ausdifferenzierte Zellen geeignet (Naldini et al., *Science* 272 (1996), 263-267; Lindemann et al., *J. Virol.* 71 (1997), 48715-4820).

10

Ein weiteres Expressionsprodukt enthält eine DNA-Sequenz des Genprodukts, das in die durch den pseudotypisierten retroviralen Vektor zu transduzierende Zelle eingeführt werden soll. Die DNA-Sequenz kann ein therapeutisches Gen, ein Gen-Fragment eines therapeutischen Gens, ein DNA-Fragment eines in der Zielzelle mutierten Gens oder ein Markergen sein. Typische Beispiele für eine DNA-Sequenz sind das CFTR-Gen, das ADA-Gen, das LDL-Rezeptor-Gen, β -Globin-Gen, Faktor-VIII-Gen oder Faktor-IX-Gen oder das Dystrophin-Gen. Im Falle des CFTR-Gens wären die Zielzellen des erfindungsgemäßen Vektors z.B. die Lungenepithelzellen, beim ADA-Gen die Stammzellen des Knochenmarks oder T-Lymphocyten, beim LDL-Rezeptor die Leberzellen, beim Dystrophin-Gen die Skelettmuskelzellen, beim β -Globin-Gen die hämatopoietischen Stammzellen, beim Faktor VIII oder Faktor IX die und Leberzellen. Dem Fachmann ist ersichtlich, daß diese Aufzählung nur eine Auswahl der therapeutischen Gene darstellt und andere Gene ebenfalls in die erfindungsgemäße Verpackungszelle zur Verpackung in die erfindungsgemäßen Vektoren transfiziert werden können. Die DNA-Fragmente eines therapeutischen Gens umfassen z.B. Antisense-Nukleinsäuren oder Ribozyme. DNA-Fragmente eines in der Zielzelle mutierten Gens können ferner Bereiche eines Gens umfassen, die die Trinukleotidwiederholungen von z.B. des Fragile X Gens umfassen. Ein Markergen oder Reportergen ist, z.B. β -Galaktosidase, "Green Flourescent Protein", Luciferase oder das Resistenzgen Neomycin. Die Herstellung solcher Expressionskonstrukte ist Stand der Technik, z.B. enthält das vom MLV abstammende Expressionskonstrukt MFG-InsLacZ die cDNA des β -Galaktosidase-Reportergens Reportergens (Takeuchi et al. *J. Virol.* 68 (1994), 8001-8007). Um den Gentransfer zu erreichen, muß die Verpackung dieses Expressionsplasmids in den retroviralen Vektor gewährleistet sein. Charakteristisch für ein solches Expressionskonstrukt ist daher das Vorhandensein einer Verpackungsstelle (ψ , ψ).

30

Die Konstruktion der gag- und pol-Expressionsprodukte für MLV, HIV, SIV, Foamyvirus ist Stand der Technik (Naldini et al., *Science* 272 (1996), 263-267; Ory, D.S., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (1996), 11400-11406; Poeschla et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (1996), 11395-11399; Buchschacher et al., *J. Virol.* 66 (1992), 2731-2739; Poznansky et al., 1991; Mammano et al., *J. Virol.* 71 (1997), 3341-3345).

Die Konstruktion der für die wt-SNV-ENV-Proteine z.B. pIM29 und die chimären SNV-scFv-ENV-Proteine kodierenden Expressionplasmide ist von Chu et al. (*J. Virol.* 71 (1997), 720-725) vorbeschrieben. Die Expression der für das wt-env-Gen kodierenden DNA wird von einem MLV-Promotor gesteuert. Die env-cDNA wurde über die Restriktionsschnittstellen SacII und AvrII aus einem für das komplette SNV-Virus kodierenden Plasmids ausgeschnitten und durch Insertion in einen Linker (L) eingefügt. Um eine korrekte Prozessierung des Proteins zu gewährleisten, enthält pIM29 die Polyadenylierungsstelle des Simianen Virus 40 (SV40). Von diesem Plasmid kann somit die Expression des wt-env-Gens erfolgen, so daß nach proteolytischer Spaltung eines Vorläuferproteins das äußere Glykoprotein (SU) und das Transmembranprotein (TM) vorliegt. Es können jedoch andere, dem Fachmann bekannte Plasmide, Promotoren, Linker, Polyadenylierungssignale und weitere für eine korrekte Prozessierung benötigte DNA-Elemente verwendet werden.

Zur Expressierung von SNV-scFv-ENV-Proteinen werden die in bekannter Weise erhaltenen scFv in ein SNV-ENV-Expressionskonstrukt z.B. pTC53 in üblicher Weise eingeführt. Die in pTC53 vorhandenen Restriktionserkennungstellen für die Enzyme SfiI und NotI ermöglichen die molekulare Klonierung von z.B. scFv's zwischen SNV-env-Leader-Sequenz und dem für das Transmembranprotein (TM-Protein) kodierenden Bereich der DNA. Die im wt-ENV vorhandene Proteaseschnittstelle zwischen SU und TM ist in pTC53 deletiert, so daß ein Fusionsprotein exprimiert wird, das N-terminal aus dem einkettigen Antikörperfragment und C-terminal aus dem SNV-TM besteht.

Die regulatorischen Elemente wie MLV-Promotor und SV40-Polyadenylierungssignal sind identisch mit denen des pIM29-Vektors. Zur Verstärkung der Expression eines chimären env-Gens wird in dem Expressionsplasmid pTC53 eine adenovirale Leader-Sequenz z.B. AVtl (Sheay et al. *BioTechniques*, 15 (1993), 856-861) inseriert. Eine Zocin-Kassette (pSV2zeo;

Fa. Invitrogen, Niederlande) dient der möglichen Selektionierung von stabil transfizierten Zellen, so daß einzelne Zellklone etabliert werden können.

5 Beliebige Antikörpererkennungsdomänen, die spezifisch für jede gewünschte Zielzelle sind, können hergestellt werden, indem eine kombinatorische Phagen-cDNA-Bibliothek der variablen Domänen der leichten und schweren Ketten der Immunglobuline hergestellt wird. Dazu wird ein Säugetier, z.B. eine Maus, Ratte, ein Kaninchen, Meerschweinchen, Ziege oder Schaf, mit einem ausreichenden Titer einer Zellpopulation in üblicher Weise immunisiert. Die Zellpopulation ist die Zellart, die einen Oberflächenrezeptor ausbildet, an den die scFv
10 spezifisch binden. Die Zellen können von einem von dem zu immunisierenden Säugetier verschiedenen Säugetier stammen, z.B. vom Menschen, der Maus, Ratte, dem Schaf, Rind oder Schwein. Die Zellen können solche Zellen sein, in der z.B. eine Gentherapie, eine Impftherapie oder Diagnostik durchgeführt werden soll. Für die Immunisierung kann eine Zellpopulation oder mehrere Zellpopulationen gleichzeitig dem Säugetier verabreicht werden,
15 je nachdem für welche Zellpopulationen der scFv spezifisch sein soll.

Für die Herstellung der cDNA-Bibliothek wird zuerst die B-Zell-RNA des immunisierten Säugetiers in bekannter Weise isoliert. Die mRNA-Sequenzen der für die Antigenerkennung verantwortlichen Regionen der schweren und leichten Kette (V_H und V_L) der Immunglobuline
20 werden mittels reverser Transkription und anschließender Polymerase-Kettenamplifikation in üblicher Weise in cDNA umgeschrieben und vervielfältigt. Die Primerpaare und deren Sequenzen für die V_H - und V_L -Regionen sind dem Fachmann bekannt. Sie sind z.B. im kommerziell erhältlichen Kit der Fa. Pharmacia enthalten, bzw. können den bekannten Datenbanken (EMBL) entnommen werden. Dem Fachmann ist bekannt, daß er für jede
25 immunisierte Säugetierart verschiedene Primersequenzen verwenden muß. Die Sequenzen sind ebenfalls in den bekannten Datenbanken enthalten. Die cDNA-Fragmente der V_H - und V_L -Regionen werden dann mittels einer Ligasereaktion in üblicher Weise zu scFv-cDNAs verknüpft. Für den Fachmann ist ersichtlich, daß bei der Ligation unterschiedliche Kombinationen von cDNA-Fragmenten hergestellt werden. Die erhaltenen scFv-cDNAs
30 können dann in einen Phagemid-Vektor z.B. pCANTA 5E Phagemid, Fa. Pharmacia kloniert werden. Anschließend werden Wirtsbakterien z.B. E.coli TG1 mit dem Phagemid-Vektor transformiert.

Die von den Bakterien produzierten rekombinanten Phagen werden dann in üblicher Weise isoliert und auf das Vorhandensein von zellspezifischen scFv-Peptiden selektioniert. Die Phagen werden mit der Zellpopulation oder den Zellpopulationen in üblicher Weise in Kontakt
5 gebracht, die für die Immunisierung verwendet worden sind. Die Phagen, die nicht an die Zellen binden, tragen kein spezifisches scFv-Peptid und werden durch Waschschrte in üblicher Weise entfernt. Die Phagen, die an die Zellen binden, präsentieren das gewünschte scFv-Peptid auf ihrer Oberfläche und werden in üblicher Weise eluiert. Die Phagen, die das gewünschte scFv-Peptid präsentieren, werden vermehrt, indem man sie wieder in üblicher
10 Weise die Wirtsbakterien infizieren läßt. Dieser Selektionsschritt kann ein oder mehrere Male wiederholt werden, um die bindenden Phagen anzureichern. Dieser Vorgang wird als "panning" bezeichnet. Die Phagen werden nach dem panning oder direkt nach dem ersten Selektionsschritt einer weiteren Selektion unterzogen. Dabei werden die Phagen mit einer oder mehreren anderen Zellpopulationen in Kontakt gebracht, die sich von den zur Immunisierung
15 verwendeten Zellen unterscheiden. Die Phagen, die nicht an diese Zellen binden, präsentieren ein zellspezifisches scFv-Peptid. Sie werden in üblicher Weise aus dem Zellüberstand isoliert und für eine Wirtsbakterieninfektion zur Vermehrung verwendet. Auch dieser Selektionsschritt kann ein oder mehrere Male wiederholt werden (Marks et al., *Biotechnologie* 10 (1992), 779; Clackson et al., *Nature* 352 (1991), 624; Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222 (1991), 581; Chaudhary et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 (1990), 1066; Chiswell et al., *TIBTECH* 10
20 (1992), 80; McCafferty et al., *Nature* 348 (1990), 552; Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988), 5879).

Die auf die beschriebene Weise selektionierten Phagen bilden die Ausgangsmaterialien zur
25 Herstellung einer Vektor-Genbank für die erfindungsgemäßen pseudotypisierten retroviralen Vektoren. Jeder Vektor des Typs [MLV/SNV-scFv-Env] enthält somit in seiner Hülle eine bestimmte scFv-Domäne. Aus der Vektor-Genbank wurden dann jene pseudotypisierten retroviralen Vektoren ausgesucht, welche den Gentransfer in die ausgewählten Zielzellen, d.h. die Zellen, mit dem das Säugetier immunisiert wurde, bewerkstelligen können. Dazu werden
30 einzelne [MLV/SNV-scFv-Env]-Vektoren mit einem einzigen scFv in der Hülle oder Pools derartiger Vektoren hergestellt und in Bezug auf ihre Fähigkeit, Gene in die ausgewählten Zellen zu übertragen, untersucht. Nur jene Vektoren und damit die zur Herstellung dieser

Vektoren benutzten scFv werden auf die beschriebene Weise ausgewählt, die den gezielten Gentransfer in die ausgewählten Zielzellen durchführen.

5 Ferner kann das SNV-Oberflächenprotein außer mit virusfremden Polypeptiden auch durch das externe Glykoprotein (SIVagm) des Simianen Immundefizienzvirus (SIV) der Afrikanischen Grünen Meerkatze (*Cercopithecus aethiops*) oder des HIV-1- oder HIV-2-ENV-Proteins ersetzt werden. Solche chimären SNV/SIV-ENV-Proteine bzw. SNV/HIV-ENV-Proteine können ebenfalls in die MLV-Kapside in der vorstehend beschriebenen Weise inkorporiert werden. Diese erfindungsgemäßen pseudotypisierten retroviralen Vektoren können zu einem
10 zellspezifischen Gentransfer in CD4-positive Lymphozyten eingesetzt werden.

Die erfindungsgemäße retrovirale Verpackungszelle zur Gewinnung der erfindungsgemäßen pseudotypisierten retroviralen Vektoren wird bereitgestellt, indem eine Zelllinie, z.B. eine humane Zelllinie mit den vorstehend beschriebenen psi-negativen Expressionskonstrukten, die für
15 die gag- und pol-Genprodukte des MLV, HIV, SIV oder Foamyvirus exprimieren, und mit dem psi-negativen SNV-Env-Expressionskonstrukt und/oder psi-negativen SNV-Env-virusfremden Polypeptid-Expressionskonstrukt, SNV/HIV- oder SNV/SIV-Expressionskonstrukt in üblicher Weise transfiziert wird.

20 Ferner können Verpackungszellen verwendet werden, die bereits die psi-negativen Expressionskonstrukte für die gag und pol-Genprodukte enthalten. Ein typisches Beispiel einer solchen MLV-abgeleiteten Verpackungszelle ist TelCeB6 (Cosset et al., *J. Virol* 69 (1995), 6314-632). In solche Verpackungszellen müssen dann nur das psi-negative Expressionskonstrukt für die Virushülle und das psi-positive Expressionskonstrukt für die in
25 die Zielzelle zu transduzierende Nukleinsäuresequenz transfiziert werden. Dem Fachmann sind die Verfahren zur Transfektion der Expressionskonstrukte bekannt. Von den erfindungsgemäßen Verpackungszellen werden retrovirale Vektorpartikel in den Zellüberstand abgegeben, die das Expressionskonstrukt enthalten nicht jedoch die Konstrukte, die für die GAG-, POL- und ENV-Proteine kodieren. In die Zielzelle wird somit nur das gewünschte z.B.
30 therapeutische Gen oder Reportergen überführt. Die gezielte Transduktion von ausgewählten Zielzellen z.B. mittels SNV/SNV-scFv-Env-Vektoren konnte bisher mit unterschiedlichen scFv gezeigt werden (Chu et al., *Gene Therapie* 1 (1994), 292-299; Chu et al., *BioTechniques* 18

(1995), 890-899). Für die Etablierung einer stabilen Verpackungszelllinie wird ein Zeozinkonstrukt eingeführt und die Verpackungszellen in üblicher Weise selektioniert.

5 Die Etablierung von stabilen Verpackungszelllinien, die sowohl das wt-SNV-ENV als auch das chimäre SNV-ENV, SNV/HIV-ENV oder SNV/SIV-ENV-Expressionskonstrukte stabil exprimieren, erlaubt die Generierung von hochtitrigen Vektorstocks. Diese sind für ein gezieltes Zelltargeting wünschenswert.

10

Die dargestellte Erfindung eröffnet die folgenden Möglichkeiten:

- Gene, Gen-Fragmente oder sonstige Nukleinsäuresequenzen können in ausgewählte Säugerzellen überführt werden,
- weitere Effizienzsteigerungen des Nukleinsäuretransfers durch Verbesserung der env-Genkonstrukte können erreicht werden,
- 15 -Gentherapie-, Markierungs- und Impfstrategien können entwickelt werden, für die ein selektiver Nukleinsäuretransfer in ausgewählte Säugerzellen wünschenswert ist.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung und sind nicht als einschränkend aufzufassen:

20

1. Isolierung und Klonierung zellspezifischer scFv

Zur Herstellung, Isolierung und Selektion von zellspezifischen scFv wurde eine Maus mit der humanen T-Zelllinie T-C8166 (Clapham et al., *Virology* 158 (1987), 44-51) in üblicher Weise immunisiert, die Milz entfernt und die RNA isoliert. Die Klonierung der scFv-cDNAs wurde
25 mit dem kommerziell erhältlichen Kit der Fa. Pharmacia nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die erhaltenen Phagen wurden in üblicher Weise auf ihre Bindungseigenschaften gegenüber den Zielzellen untersucht.

2. Klonieren der spezifischen scFv-cDNA-Fragmente in Env-Expressionskonstrukte

30 Vier so erhaltene zellspezifische scFv (M8, K6, 7A5, 7E10) wurden verwendet, um pseudotypisierte MLV-SNV-scFv-Vektoren herzustellen. Die scFv-cDNAs der vorstehend bezeichneten zellspezifischen scFv wurden in üblicher Weise aus der Phagemid-DNA ausgeschnitten und in das Expressionskonstrukt pTC53 ligiert. pTC53 wurde erhalten durch

Modifizierung des universellen eukaryotischen Vektors pRD114 (Chu et al., *J. Virol.* 71 (1997), 720-725; Sheay et al. *BioTechniques*, 15 (1993), 856-861; Chu et al., *BioTechniques*, 18 (1995), 890-895). In diesem Vektor wurde das SNV-wt-env-Gen bis auf die für die Leader-Sequenz und das Transmembran-Protein kodierende cDNA deletiert. Ein zusätzlich eingeführter Spacer ermöglicht die Insertion einer Fremd-DNA (hier die scFv-cDNA) im Anschluß an die ENV-Leader-Sequenz über die Restriktionserkennungsstelle NaeI. Die Sequenz von pTC53 ist in Abbildung 4 gezeigt. Für die Insertion der scFv-cDNA wurde das Env-Expressionskonstrukt pTC53 dahingehend modifiziert, daß Sfi I und Not I spezifische Restriktionsendonuklease-Erkennungsstellen in den Linker zwischen der SNV-Leader-Sequenz und der SNV-Transmembran-Sequenz (TM) in üblicher Weise eingefügt werden. Hierzu wird eine rekombinante PCR ausgehend von der DNA des Plasmids PKA1558 (Scov H. & Andersen K.B., 1993) und der für das anti Transferrinrezeptor-scFv kodierenden DNA in üblicher Weise durchgeführt, so daß über Nru I (5' und 3') eine Insertion des amplifizierten Fragments in das Nae I restringierte pTC53 möglich ist. Das so inserierte Fragment enthält die multiple Sfi I / Not I Klonierungsstelle, da die verwendeten Primer neben der endständigen Nru I Erkennungsstelle weiterhin eine benachbarte Sfi I bzw. Not I Erkennungsstelle beinhalten. Für die rekombinante PCR wurden folgende Primer verwendet

PKATFNNRu+:

5'-GGGCCCTCGCGAGCGGCCCGCCGACATCAAGATGACCCAGTCTCCA-3'

Nru I

Sfi I

PKATFNNRu-:

5'-GGGCCCTCGCGATGCGGCCGCTGAGGAGACTGTGAGAGTGGTGCC-3'

Nru I

Sfi I

Die PCR-Bedingungen waren: 94°C/3 min, 94°C/1 min, 59°C/1 min, 72°C/1 min., 25 X Schleifen, 72°C/10 min und dann bis 4°C abkühlen. Das PCR-Fragment wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt, aus der Gelmatrix extrahiert (Quiaex, Fa. Quiagen) und mit dem Nae I geöffneten Plasmid pTC53 in üblicher Weise ligiert.

Die scFv-cDNAs aus dem Phagemid (*pCANTA 5E*) wurden mittels der Restriktionsendonukleasen Sfi I und Not I ausgeschnitten. Dazu wurde Phagemid-Plasmid-DNA mittels bekannter Verfahren hergestellt, und jeweils 8 µg Plasmid-DNA mit jeweils 60 U

der Restriktionsendonukleasen Sfi I und Not I für 1,5h bei 50°C und anschließend 1,5h bei 37°C verdaut. Der Reaktionsansatz fand in einem Volumen von 200µl statt, der mit 20µl BSA (10fach konz.) und 20µl Reaktionspuffer 3 (10fach konz.) supplementiert wurde. Nach Beendigung der Reaktionszeit wurde der Ansatz in einem 1%igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach der Auftrennung wurde die scFv-cDNA spezifische Bande (ca 750bp) aus dem Agarosegel mittels bekannter Verfahren aufgereinigt.

Das aufgereinigte Fragment wurde mit dem ebenfalls mit den Reastriktionsendonukleasen Sfi I und Not I geöffneten Env-Expressionskonstrukt pTC53 ligiert. Dazu wurden äquimolare Mengen des scFv-cDNA-Fragments und pTC53-Fragments in einem 15µl Volumen mit 200 U T4-Ligase und 1,5µl 10-fach Ligase-Puffer supplementiert. Der Ansatz wurde bei 4°C Über Nacht inkubiert. Um eine effiziente Transformation von Bakterien zu ermöglichen, wurden die Bakterienstämme TOP10F' und JS5 mit einer nach Hanahan (1983) modifizierten Methode kompetent gemacht. Nach dem Animpfen von 100 ml LB-Medium mit 500 µl einer Übernachtskultur wurde die Bakteriensuspension bei 37° C bis zu einer Dichte (OD₅₅₀) von 0,6 inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien auf Eis gekühlt, bei 6.000 rpm und 4° C pelletiert (Minifuge RF, Heraeus, Hanau) und in 40 ml TFB1-Puffer (30 mM KOAc, 100mM RbCl₂, 10 mM CaCl₂, 15 % Glycerin, pH 5,8 mit Essigsäure eingestellt, danach sterilfiltriert) resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten auf Eis und einer Zentrifugation bei 6.000 rpm und 4° C wurde das Bakterienpellet in 4 ml TFB2-Puffer (10 mM MOPS, 75 mM CaCl₂, 10 mM RbCl₂, 15 % Glycerin, pH 6,5 mit KOH-Lösung eingestellt, danach sterilfiltriert) resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde dann in Aliquots je 100 µl aufgeteilt und auf Trockeneis schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -70° C. Zur Transformation wurden 100 µl der kompetenten Bakterien auf Eis aufgetaut und nach Zugabe von 1-2 µl des jeweiligen Ligationsansatzes für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem anschließenden Temperaturschock (45 s bei 42° C anschließend 2 min auf Eis) wurden die Bakterien mit 500 µl SOC-Medium (GIBCO/BRL, Eggenstein) versetzt und bei 37° C für eine Stunde zur Expression der Antibiotikaresistenz in einem Bakterien-schüttler kultiviert. Die Bakteriensuspension wurde auf LB-Agarplatten, die mit dem Antibiotikum Ampicillin supplementiert waren, ausgestrichen und bei 37° C über Nacht inkubiert.

Die Präparation von Plasmiden aus Bakterien (E.coli TopF10) erfolgte mit den QIAGEN-Plasmid-Kits der Firma QIAGEN, Hilden. Für die Präparation einer geringen Menge Plasmid-DNA wurden die Bakterien einer 15 ml-Übernachtskultur (LB-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin) mit den vom Hersteller gelieferten Lösungen lysiert und über eine
5 Anionenaustauscher-Säule (tip-20) gereinigt. Zur Gewinnung großer Mengen Plasmid-DNA (Maxi-Präparation) wurden 400 ml Übernachtskulturen angesetzt

2. Transfektion der Verpackungszellen

Zunächst wurde getestet, ob eine Inkorporation des wt-SNV-ENV-Proteins in die MLV-Kapside erfolgt. Hierfür wurden 2µg DNA des Expressionskonstruktes pIM29 (Dornburg,
10 *Gene Therapie* 2 (1995), 1-10), das für das wt-ENV-Protein kodiert, durch eine liposomenvermittelte Gentransfertechnik (Lipofektion) in die Verpackungszellen TelCeB6 eingebracht. Die DNA wurde in einem Gesamtvolumen von 100µl in Medium (DMEM) aufgenommen. 2,5µl des Lipofektamins (Fa. Gibco, Eggenstein) wurden ebenfalls in einem
15 Gesamtvolumen von 100µl Medium aufgenommen. Beide Lösungen wurden gemischt und für 30min. bei Raumtemperatur inkubiert, so daß sich Liposomen-DNA-Komplexe bilden konnten. Anschließend wurde mit 800µl Medium aufgefüllt und die Lösung wurde auf die zu transfizierenden Zellen gegeben. Die Zellen wurden für vier Stunden bei 37°C und 5%CO₂ im Brutschrank inkubiert und anschließend erfolgte ein Mediumwechsel (DMEM, 10%FKS, NSP)
20 Die transfizierten Zellen wurden 3 weitere Tage bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, um die Expression des Wildtyp-env-Gens zu ermöglichen. Hierbei erfolgte kein Mediumwechsel.

3. Transduktion von Zielzellen mittels verschiedener MLV/SNV-Vektoren

Der Zellüberstand der transfizierten Zellen wurde drei Tage nach der Transfektion in üblicher
25 Weise geerntet und filtriert (0,45µm-Filter), so daß alle Verpackungszellen entfernt wurden. Zwei ml dieses zellfreien Zellüberstand wurde zur Transduktion von 2×10^5 Zellen der Hunde-Osteosarkom-Zelllinie D17 (Watanabe und Temin, *Mol. Cell Biol.* 3 (1983), 2241-2249;) in üblicher Weise eingesetzt. Diese Zellen sind permissiv für SNV, wobei der von SNV angesteuerte natürliche Rezeptor bisher unbekannt ist. Die Transduktion wurde in Gegenwart
30 von 40µg/ml Polybren für 4 Stunden durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen zwei mal mit 3 ml PBS gewaschen und es erfolgte ein Mediumwechsel. Zur Überprüfung einer erfolgreichen Transduktion wurde nach 72 Stunden ein X-Gal-Test nach der Methode von Sanes et al. (1986) durchgeführt: Der Zellkulturüberstand wurde abgezogen und die Zellen mit

PBS ohne (Ca^{2+} und Mg^{2+}) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit einer Fixierlösung (2 % Formaldehyd, 0,2 % Glutaraldehyd in PBS) für 5 min überschichtet und mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen in 3 ml X-Gal-Reaktionsmischung (1 mg/ml, 5 mM K-Ferricyanid, 5 mM K-Ferrocyanid, 2mM MgCl_2) resuspendiert. Nach einer ca. 4-stündigen Inkubation des Ansatzes bei 37° C trat die Blaufärbung der transduzierten Zellen auf. Die Blaufärbung läßt auf die Expression der β -Galaktosidase schließen, die nur erfolgen kann, wenn das Expressionskonstrukt MFG-nlsLacZ erfolgreich in die Zielzellen transferiert wurde. Zur Bestimmung des Vektortiters wurden im Mikroskop jeweils 10 Gesichtsfelder der Zellen auf blaue Zellen untersucht. Die durchschnittliche Anzahl der blauen Zellen pro Gesichtsfeld wurde auf die gesamte Fläche des Zellkulturgefäßes (6-Loch-Platte der Fa. Nunc, Wiesbaden, 962mm²) extrapoliert und auf einen ml Zellkulturüberstand standartisiert.) Der in diesem transienten Test erreichte Titer lag bei 2×10^4 Vektorpartikeln / ml Zellüberstand

4. Transduktion von Zielzellen mittels verschiedener MLV/SNV-scFv-Vektoren
- Ob ein gezielter Gentransfer mittels verschiedener MLV/SNV-Vektoren mit Antikörpererkennungsfragmenten möglich ist, wurde durch die Kotransfektion von jeweils 2µg DNA SNV-scFv-Expressionskonstrukte und 2µg DNA des für das Wildtyp-ENV-Protein kodierenden Plasmids pIM29 in die Verpackungszellen TelCeB6 getestet. Die verwendeten Expressionskonstrukte pTC53-7A5 zeo, pTC53-M8 zeo, pTC53-K6-2 zeo und pTC53-7E10 zeo enthielten jeweils scFv's, die gegen bisher undefinierte Rezeptoren der lymphoiden Zelllinie C8166 (Clapham et al., *Virology* 158 (1987), 44-51) gerichtet sind. Die genannten Konstrukte sind SNV-scFv-ENV Expressionsplasmide der in Beispiel 1 erhaltenen scFv. Die CD4-positiven Zelllinien C8166 und Molt4/8 wurde mit dem in Beispiel 3. beschriebenen Verfahren mit zellfreien Überständen transduziert. Durch Transduktion des Pseudotyps [MLV/ SNV pTC53-7E10 zeo] konnte auf C8166-Zellen ein Titer von 5×10^3 Vektorpartikel / ml Zellkulturüberstand erreicht werden, während auf HeLa-Zellen (Epithelzelllinie) kein Gentransfer im X-Gal-Test nachgewiesen wurde. Somit fand eine zellspezifische Transduktion statt. Bei der Transduktion der vorstehend aufgeführten vier MLV-SNV-scFv-Pseudotypen in Molt4/8 Zellen konnte ebenfalls ein Titer von von 5×10^3 Vektorpartikel / ml Zellkulturüberstand erreicht werden.

5. Etablierung von stabilen Verpackungszelllinien

Zunächst wurde eine MLV-abgeleitete Verpackungszelllinie hergestellt, die das wt-SNV-ENV-Protein stabil exprimiert. Das Expressionskonstrukt pIM29 (2µg DNA) und das Hygromycin exprimierende Konstrukt pREP4 (0,1µg DNA) (Invitrogen, Belgien) werden hierfür in die Verpackungszelllinie TelCeB6 kotransfiziert. Die experimentelle Vorgehensweise ist unter Punkt 2. beschrieben. Drei Tage nach Transfektion werden die transfizierten Zellen in unterschiedlichen Konzentrationen (1/10, 3/10 und 5/10 des Gesamtvolumens) auf drei 100mm Kulturplatten ausgesät. Die Zellen werden 24 Stunden inkubiert und anschließend wurde ein Mediumwechsel vorgenommen (DMEM, 10% FKS, 200µg/ml Hygromycin). Nicht hygromycin-resistente Zellen lösten sich von dem Zellkulturgefäß ab, so daß einzelne resistente Zell-Kolonien abgenommen werden konnten. Diese Zellklone wurden expandiert und anschließend in einer Transduktion von D17-Zielzellen auf das Vorhandensein des wt-SNV-ENV-Proteins getestet. Die so etablierte TelCeB6-pIM29-hygro Zelllinie kann zur Transfektion eines weiteren Expressionskonstruktes benutzt werden. Die Transfektion des chimären SNV-scFv-ENV verläuft analog dem o. g. Verfahren. Zur Selektion eines das chimäre SNV-scFv-ENV stabil exprimierenden Zellklons wird jedoch G418-haltiges DMEM-Medium verwandt, da die chimären env-Konstrukte das Neomycin-Resistenzgen enthalten.

Patentansprüche

1. Retroviraler Vektor, umfassend einen Viruskern ausgewählt aus der Gruppe murines Leukämievirus (MLV), menschliches Immunschwächevirus (HIV), Affen-
5 Immunschwächevirus (SIV), Lentivirus oder Foamyvirus und eine Virushülle vom Milz-Nekrosevirus (SNV).
2. Vektor nach Anspruch 1, wobei die Virushülle das Vollängen-Oberflächenprotein (SU-Protein) des SNV und/oder ein chimäres SNV-virusfremdes Polypeptid-ENV, SNV-
10 HIV-ENV oder SNV-SIV-ENV umfaßt.
3. Vektor nach Anspruch 1 oder 2, wobei das virusfremde Polypeptid einen Ligand, ein Peptidfragment eines Liganden, einen Antikörper, ein Peptidfragment eines Antikörpers
15 oder eine Antikörpererkennungsdomäne (scFv) umfaßt.
4. Vektor nach einem der Ansprüche 1 bis 3, weiter umfassend eine RNA, die in die durch den retroviralen Vektor zu transduzierende Zelle eingeführt werden soll.
- 20 5. Vektor nach Anspruch 4, wobei die RNA ein therapeutisches Gen-Transkript oder dessen Nukleinsäurefragment und/oder ein Reportergen und/oder ein Resistenzgen-Transkript umfaßt.
- 25 6. Vektor nach Anspruch 5, wobei das therapeutische Gen-Transkript oder dessen Nukleinsäurefragment das CFTR-, phox91-, ADA-, IL-16-, p53- oder revM10-Gen-Transkript und ein oder mehrere Impfgene-Transkripte z. B. rekombinantes gp120 und IL-16 umfaßt.
- 30 7. Vektor nach Anspruch 4, wobei das Reportergen-Transkript β -Galaktosidase, "Green Flourescent Protein", Luciferase und das Resistenzgen-Transkript Neomycin oder "multiple drug resistance gene" umfaßt.

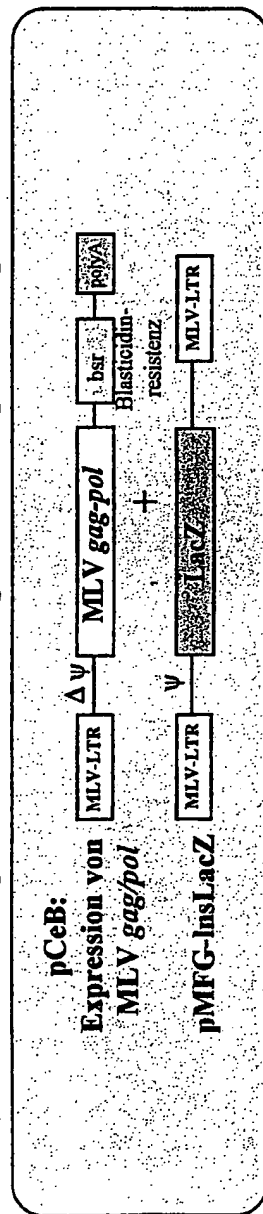
8. Verwendung der Vektors nach einem der Ansprüche 1 bis 7 als Arzneimittel.
- 5 9. Verwendung des Vektors nach Anspruch 8 zur Herstellung eines Arzneimittels zur somatischen Gentherapie, Impftherapie oder Diagnostik.
- 10 10. Verwendung des Vektors nach Anspruch 8 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Therapie der Cystischen Fibrose, des ADA-Mangels, der chronischen Granulomatose oder der HIV-1 Infektion.
- 15 11. Retrovirale Verpackungszelle zur Gewinnung der retroviralen Vektoren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, transformiert sowohl mit einem oder mehreren psi-negativen Expressionskonstrukt(en), die die gag- und pol-Genprodukte des MLV, HIV, SIV oder Foamyvirus exprimieren, als auch mit einem psi-negativen SNV-Env-Expressionskonstrukt und/oder psi-negativen SNV-Env-virusfremden Polypeptid-, SNV-HIV-ENV- oder SNV-SIV-ENV-Expressionskonstrukt.
- 20 12. Verpackungszelle nach Anspruch 11, wobei das virusfremde Polypeptid einen Liganden, ein Peptidfragment eines Liganden, einen Antikörper, ein Peptidfragment eines Antikörpers oder eine Antikörpererkennungsdomäne (scFv) umfaßt.
- 25 13. Verpackungszelle nach Anspruch 11, ferner umfassend ein psi-positives Expressionskonstrukt, umfassend eine Nukleinsäuresequenz, die in die durch den retroviralen Vektor zu transduzierende Zelle eingeführt werden soll.
- 30 14. Verpackungszelle nach Anspruch 13, wobei die Nukleinsäuresequenz ein therapeutisches Gen oder dessen Nukleinsäurefragment und/oder ein Reportergen und/oder ein Resistenzgen umfaßt.
15. Verpackungszelle nach Anspruch 14, wobei das therapeutische Gen oder dessen Nukleinsäurefragment das CFTR-, phox91-, ADA-, IL-16-, p53- oder revM10-Gen oder ein oder mehrere Impfgene z. B. rekombinantes gp120 und IL-16 umfaßt.

16. Verpackungszelle nach Anspruch 13, wobei das Reportergen ausgewählt ist aus der Gruppe β -Galaktosidase, "Green Fluorescent Protein", Luciferase und das Resistenzgen aus der Gruppe Neomycin oder "multiple drug resistance gene".

Herstellung von MLV-SNV Vektoren

TelCeB6:

MLV abgeleitete *env*-negative Verpackungszelle



SNV - *env*
+ Expressionskonstrukte
(pIM29, pT-scFv)

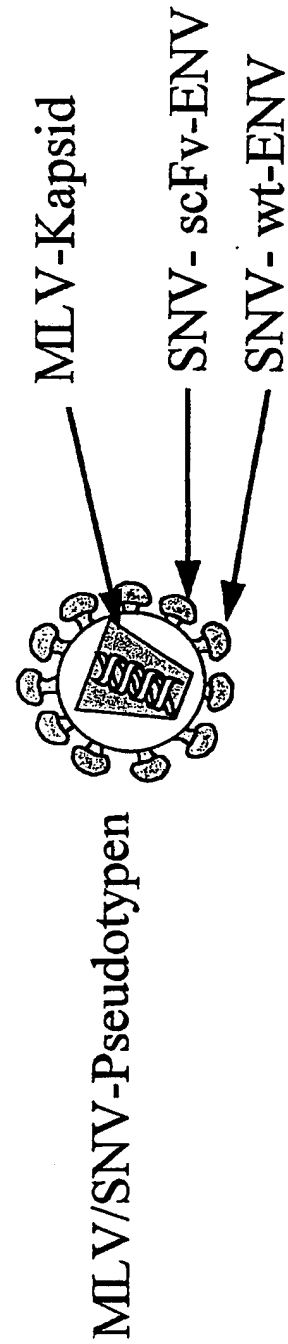
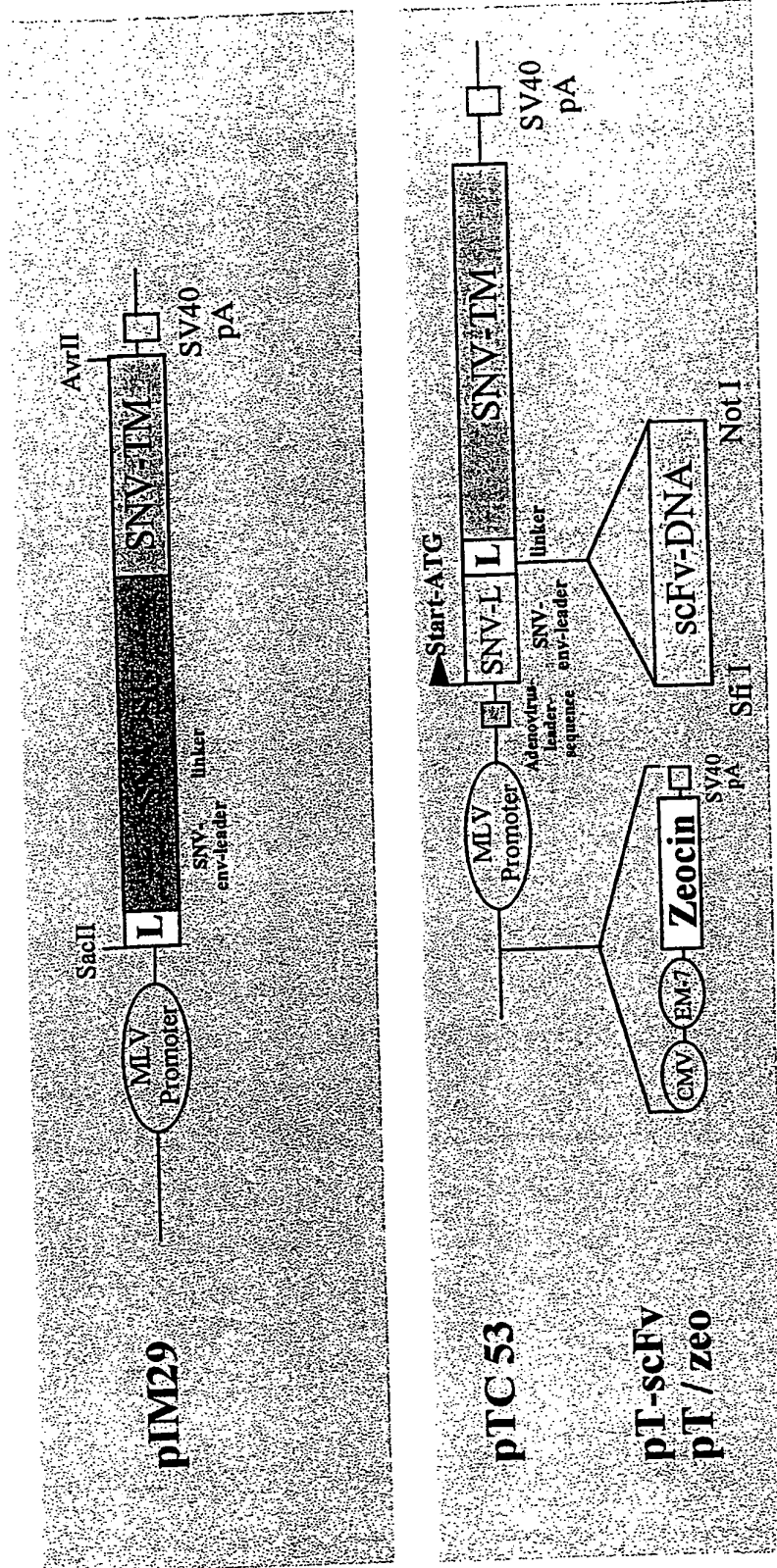


Abb. 1

wt-SNV-*env*- und SNV-scFv-*env*-Konstrukte



Generating a library of MLV/SNV-scFv-Env vectors

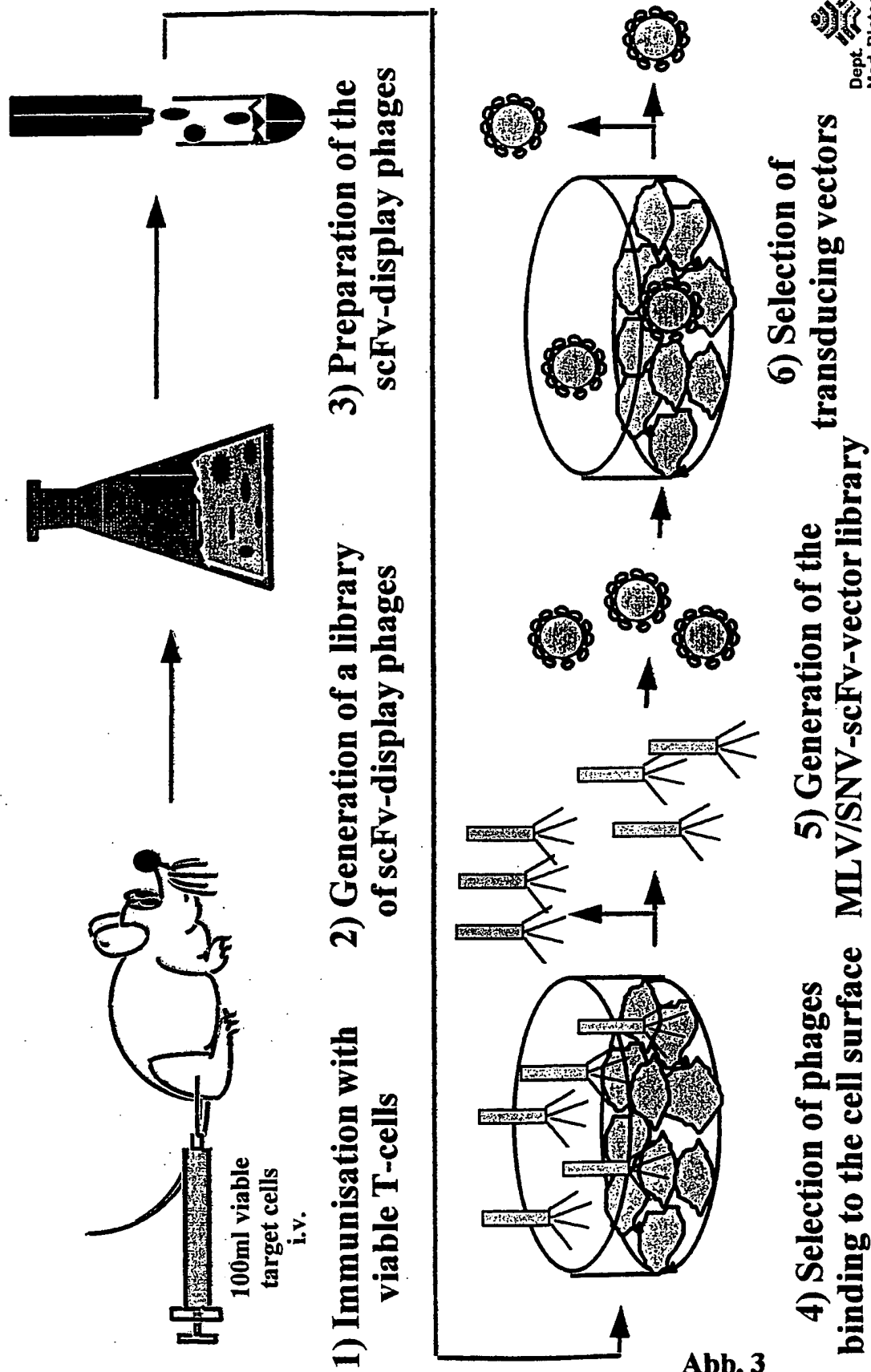


Abb. 3

DNA sequence **4776 b.p.** **CATACCTGTC ... TACTTCTTCT** **linear**

Abb. 4 A

[illegible]

Abb. 4 B

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Bundesrepublik Deutschland letztvertreten durch den
Präsidenten des Paul-Ehrlich-Instituts
(B) STRASSE: Paul-Ehrlich-Str. 51-59
(C) ORT: Langen
(E) LAND: Deutschland
(F) POSTLEITZAHL: 63225

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Retrovirale Pseudotyp-Vektoren mit
modifizierten Oberflächen-Hüllproteinen und Verfahren zu
ihrer Herstellung für den selektiven Gentransfer

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 32

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
(B) COMPUTER: IBM PC compatible
(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(v) DATEN DER FRÜHEREN ANMELDUNG:

ANMELDENUMMER: DE 197 52 855.4
ANMELDETAG: 28-11-1997

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 4776 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Doppelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

GAATTC	CCCGT	ACGAGC	CATA	GATAAA	AATAA	AAGATTT	TAT	TAGTCT	CCA	GAAAAGGGG	60
GGAATG	AAAG	ACCCAC	CTG	TAGGTT	TGGC	AAGCTAG	CCTT	AAGTAAC	GCC	ATTTGCAAG	120
GCATGG	AAAA	ATACATA	ACT	GAGAATA	GAG	AAGTTC	AGAT	CAAGGTC	AGG	AACAGATGGA	180
ACAGCT	GAAAT	ATGGGG	CCAAA	CAGGATAT	CT	GTGGTA	AGCA	GTTCTG	CCCC	CGGCTCAGGG	240
CCAAGA	ACAG	ATGGAAC	AGC	TGAATAT	GGG	CCAACAG	GGA	TATCTGT	TGGT	AAGCAGTTCC	300
TGCCCC	GGGCT	CAGGGC	CAAG	AACAGAT	GGT	CCCCAG	ATGC	GGTCCAG	CCC	TCAGCAGTTT	360
CTAGAGA	AACC	ATCAGAT	GTT	TCCAGGG	TGC	CCCAAGG	ACC	TGAAATG	ACC	CTGTGCCTTA	420
TTTGAAC	TAA	CCAATC	AGTT	CGCTTCT	CGC	TTCTGTT	CGC	GCGCTT	CTGC	TCCCCGAGCT	480

	CAATAAAAGA GCCCACAACC CCTCACTCGG GCGCCAGTC CTCCGATTGA CTGAGTCGCC	540
	CGGGTGGGGG AGCTCGCTGT TGGGCTCGCG GTTGAGGACA AACTCTTCGC GGTCTTTCCA	600
5	GTACTCTTGG ATCGGAAACC CGTCGGCCTC CGAACGGTAC TCCGCCACCG AGGGACCTGA	660
	GCGAGTCCGC ATCGACCGGA TCGGAAAACC TCTCGAGAAA GCGGTCTAAC CAGTCACAGT	720
10	CGCAAGGTAG GCTGAGCACC GTGGCCGGGC GGCACGGGTG GCGGTCGGGG TTGTTTCTGG	780
	CGGAGGTGCT GCTGATGATG TAATTAAGTA GGCGGTCTTG AGACGGCGAT GGTCGAGGTG	840
	AGGTGTGGCA GGCTTGAGAT CTGGCCATAC ACTTGAGTGA CAATGACATC CACTTTGCCT	900
15	TTCTCTCCAC AGGTGTCCAC TCCCAGGTCC AACC GGATCC GAGCTCCACC GCGGTAAAGG	960
	TCGCTGGGAA GACCCCGTGG ATCCACCACT CTCGACTCAA GAAAGCTCCT GACAACCAAG	1020
20	AAGAATGGAC TGTCTCACCA ACCTCCGATC CGCTGAGGGT AAAGTTGACC AGGCGAGCAA	1080
	AATCCTAATT CTCCTTGTGG CTTGGTGGGG GTTTGGGACC ACTGCCGAAG TTTCGACTGC	1140
	CGGCTCCGGG GCGGTGTTT CTGGTGGTGG TTCTGGTGGT GGTGGTCTG GTGGTGGTGG	1200
25	TTCTGGCGCC AGCCAGTCC AGTTTATCCC CCTGCTTGTG GGTCTAGGGA TTTCAGGGGC	1260
	TACACTTGCT GGTGGAACGG GGCTTGGGGT CTCCGTTTAC ACTTATCACA AGCTCTCTAA	1320
30	TCAATTGATT GAAGATGTCC AGGCTCTTTC AGGGACCATC AATGACCTAC AGGACCAGAT	1380
	TGACTCCCTG GCTGAGGTTG TCTTACAAAA TAGAAGAGGG TTAGACCTAT TGACTGCCGA	1440
	ACAAGGAGGA ATATGTCTCG CACTCCAGGA GAAGTGTGTG TTTTACGCTA ACAAGTCGGG	1500
35	TATCGTACGT GACAAGATCC GAAAACTCCA AGAGGACCTT ATCGAGAGAA AACGTGCACT	1560
	GTACGACAAC CCCCTGTGGA GCGGCTTGAA CGGCTTCCTT CCATATTTGC TACCCTTGTT	1620
40	AGGCCCCCTG TTTGGGCTCA TATTGTTCTT GACCCCTCGGC CCGTGCATTA TGAAGACCCT	1680
	GACTCGCATT ATACATGACA AAATTCAGGC AGTAAAATCC TAGCACTAGT CCCACAGTAC	1740
	AAGCCACTCC CAACAGAGAT GGATACCCTA GGGGTCCGAT GGTCTAAGAA TTCTCGAGTC	1800
45	TAAGATCGAT CGAATTCCTA GGTCAATGAT TTGACCAGAA TGTACAAGAG CAGTGGGGAA	1860
	TGTGGGAGGG GCTTACGAAG GCCTTAAGTG ACTAGGTACC CGATCCAGAC ATGATAAGAT	1920
50	ACATTGATGA GTTGGGACAA ACCACAACCTA GAATGCAGTG AAAAAAATGC TTTATTTGTG	1980
	AAATTTGTGA TGCTATTGCT TTATTTGTAA CCATTATAAG CTGCAATAAA CAAGTTAACA	2040
	ACAACAATTG CATTCAATTT ATGTTTCAGG TTCAGGGGGA GGTGTGGGAG GTTTTTTAAA	2100
55	GCAAGTAAAA CCTCTACAAA TCAAGCTGGG CAAGCTAGAT CTAGCTTGGC GTAATCATGG	2160
	TCATAGCTGT TTCCTGTGTG AAATTGTTAT CCGCTCACAA TTCCACACAA CATACGAGCC	2220

	GGAAGCATAA AGTGTAAGC CTGGGGTGCC TAATGAGTGA GCTAACTCAC ATTAATTGCG	2280
	TTGCGCTCAC TGCCCCGCTTT CCAGTCGGGA AACCTGTCGT GCCAGCTGCA TTAATGAATC	2340
5	GGCCAACGCG CGGGGAGAGG CGGTTTGCCT ATTGGGCGCT CTTCCGCTTC CTCGCTCACT	2400
	GACTCGCTGC GCTCGGTCGT TCGGCTGCGG CGAGCGGTAT CAGCTCACTC AAAGGCGGTA	2460
	ATACGGTTAT CCACAGAATC AGGGGATAAC GCAGGAAAGA ACATGTGAGC AAAAGGCCAG	2520
10	CAAAAGGCCA GGAACCGTAA AAAGGCCGCG TTGCTGGCGT TTTTCCATAG GCTCCGCCCC	2580
	CCTGACGAGC ATCACAAAAA TCGACGCTCA AGTCAGAGGT GGCAGAACCC GACAGGACTA	2640
15	TAAAGATACC AGGCGTTTCC CCCTGGAAGC TCCCTCGTGC GCTCTCCTGT TCCGACCCTG	2700
	CCGCTTACCG GATACCTGTC CGCCTTTCTC CCTTCGGGAA GCGTGGCGCT TTCTCAATGC	2760
	TCACGCTGTA GGTATCTCAG TTCGGTGTAG GTCGTTGCT CCAAGCTGGG CTGTGTGCAC	2820
20	GAACCCCCCG TTCAGCCCCG CCGCTGCGCC TTATCCGGTA ACTATCGTCT TGAGTCCAAC	2880
	CCGGTAAGAC ACGACTTATC GCCACTGGCA GCAGCCACTG GTAACAGGAT TAGCAGAGCG	2940
25	AGGTATGTAG GCGGTGCTAC AGAGTTCTTG AAGTGGTGGC CTAACACGG CTACACTAGA	3000
	AGGACAGTAT TTGGTATCTG CGCTCTGCTG AAGCCAGTTA CCTTCGGAAA AAGAGTTGGT	3060
	AGCTCTTGAT CCGGCAAACA AACCACCGCT GGTAGCGGTG GTTTTTTTGT TTGCAAGCAG	3120
30	CAGATTACGC GCAGAAAAAA AGGATCTCAA GAAGATCCTT TGATCTTTTC TACGGGGTCT	3180
	GACGCTCAGT GGAACGAAAA CTCACGTAA GGGATTTTGG TCATGAGATT ATCAAAAAGG	3240
35	ATCTTCACCT AGATCCTTTT AAATTAATAA TGAAGTTTAA AATCAATCTA AAGTATATAT	3300
	GAGTAAACTT GGTCTGACAG TTACCAATGC TTAATCAGTG AGGCACCTAT CTCAGCGATC	3360
	TGTCTATTTT GTTCATCCAT AGTTGCCTGA CTCCCCGTCG TGTAGATAAC TACGATACGG	3420
40	GAGGGCTTAC CATCTGGCCC CAGTGCTGCA ATGATACCGC GAGACCCACG CTCACCGGCT	3480
	CCAGATTTAT CAGCAATAAA CCAGCCAGCC GGAAGGGCCG AGCGCAGAAG TGGTCCTGCA	3540
45	ACTTTATCCG CCTCCATCCA GTCTATTAAT TGTGCGCGG AAGCTAGAGT AAGTAGTTCTG	3600
	CCAGTTAATA GTTTGCGCAA CGTTGTTGCC ATTGCTACAG GCATCGTGGT GTCACGCTCG	3660
	TCGTTTGGTA TGGCTTCATT CAGCTCCGGT TCCCAACGAT CAAGGCGAGT TACATGATCC	3720
50	CCCATGTTGT GCAAAAAAGC GGTTAGCTCC TTCGGTCCTC CGATCGTTGT CAGAAGTAAG	3780
	TTGGCCGCGAG TGTTATCACT CATGGTTATG GCAGCACTGC ATAATTCTCT TACTGTCATG	3840
55	CCATCCGTAA GATGCTTTTC TGTGACTGGT GAGTACTCAA CCAAGTCATT CTGAGAATAG	3900
	TGTATGCGGC GACCGAGTTG CTCTTGCCCG GCGTCAATAC GGGATAATAC CGCGCCACAT	3960
	AGCAGAACTT TAAAAGTGCT CATCATTGGA AAACGTTCTT CGGGGCGAAA ACTCTCAAGG	4020

5
10
15
20
25

ATCTTACCGC TGTGAGATC CAGTTCGATG TAACCCACTC GTGCACCCAA CTGATCTTCA 4080
GCATCTTTTA CTTTCACCAG CGTTTCTGGG TGAGCAAAAA CAGGAAGGCA AAATGCCGCA 4140
AAAAAGGGAA TAAGGGCGAC ACGGAAATGT TGAATACTCA TACTCTTCCT TTTTCAATAT 4200
TATTGAAGCA TTTATCAGGG TTATTGTCTC ATGAGCGGAT ACATATTGA ATGTATTTAG 4260
AAAAATAAAC AAATAGGGGT TCCGCGCACA TTTCCCCGAA AAGTGCCACC TGACGTCTAA 4320
GAAACCATTA TTATCATGAC ATTAACCTAT AAAAATAGGC GTATCACGAG GCCCTTTCGT 4380
CTCGCGCGTT TCGGTGATGA CGGTGAAAAC CTCTGACACA TGCAGCTCCC GGAGACGGTC 4440
ACAGCTTGTC TGTAAGCGGA TGCCGGGAGC AGACAAGCCC GTCAGGGCGC GTCAGCGGGT 4500
GTTGGCGGGT GTCGGGGCTG GCTTAACTAT GCGGCATCAG AGCAGATTGT ACTGAGAGTG 4560
CACCATATGC GGTGTGAAAT ACCGCACAGA TCGGTAAGGA GAAAATACCG CATCAGGCGC 4620
CATTCGCCAT TCAGGCTGCG CAACTGTTGG GAAGGGCGAT CGGTGCGGGC CTCTTCGCTA 4680
TTACGCCAGC TGGCGAAAGG GGGATGTGCT GCAAGGCGAT TAAGTTGGGT AACGCCAGGG 4740
TTTTCCCAGT CACGACGTTG TAAAACGACG GCCAGT 4776

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

30

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 12 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

35

(ii) ART DES MOLEKUELS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Met Lys Asp Pro Thr Cys Arg Phe Gly Lys Leu Ala

5

10

40

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 21 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

45

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKUELS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

Met Glu Lys Tyr Ile Thr Glu Asn Arg Glu Val Gln Ile Lys Val Arg

5

10

15

Asn Arg Trp Asn Ser

5

20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 8 Aminosäuren

10

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKUELS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Met Gly Gln Thr Gly Tyr Leu Trp

15

5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 13 Aminosäuren

20

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKUELS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

Met Glu Gln Leu Asn Met Gly Gln Thr Gly Tyr Leu Trp

25

5

10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 12 Aminosäuren

30

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKUELS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

Met Val Pro Arg Cys Gly Pro Ala Leu Ser Ser Phe

35

5

10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 10 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKUELS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

5 Met Phe Pro Gly Cys Pro Lys Asp Leu Lys

5

10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

10

(A) LÄNGE: 15 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKUELS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

15 Met Val Glu Val Arg Cys Gly Arg Leu Glu Ile Trp Pro Tyr Thr

5

10

15

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

20

(A) LÄNGE: 24 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKUELS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

25 Met Thr Ser Thr Leu Pro Phe Ser Pro Gln Val Ser Thr Pro Arg Ser

5

10

15

Asn Arg Ile Arg Ala Pro Pro Arg

20

30 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 232 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

35

(ii) ART DES MOLEKUELS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

Met Asp Cys Leu Thr Asn Leu Arg Ser Ala Glu Gly Lys Val Asp Gln
 5 10 15
 Ala Ser Lys Ile Leu Ile Leu Leu Val Ala Trp Trp Gly Phe Gly Thr
 20 25 30
 5 Thr Ala Glu Val Ser Thr Ala Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 35 40 45
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ala Ser Pro
 50 55 60
 Val Gln Phe Ile Pro Leu Leu Val Gly Leu Gly Ile Ser Gly Ala Thr
 10 65 70 75 80
 Leu Ala Gly Gly Thr Gly Leu Gly Val Ser Val His Thr Tyr His Lys
 85 90 95
 Leu Ser Asn Gln Leu Ile Glu Asp Val Gln Ala Leu Ser Gly Thr Ile
 100 105 110
 15 Asn Asp Leu Gln Asp Gln Ile Asp Ser Leu Ala Glu Val Val Leu Gln
 115 120 125
 Asn Arg Arg Gly Leu Asp Leu Leu Thr Ala Glu Gln Gly Gly Ile Cys
 130 135 140
 Leu Ala Leu Gln Glu Lys Cys Cys Phe Tyr Ala Asn Lys Ser Gly Ile
 145 150 155 160
 20 Val Arg Asp Lys Ile Arg Lys Leu Gln Glu Asp Leu Ile Glu Arg Lys
 165 170 175
 Arg Ala Leu Tyr Asp Asn Pro Leu Trp Ser Gly Leu Asn Gly Phe Leu
 180 185 190
 25 Pro Tyr Leu Leu Pro Leu Leu Gly Pro Leu Phe Gly Leu Ile Leu Phe
 195 200 205
 Leu Thr Leu Gly Pro Cys Ile Met Lys Thr Leu Thr Arg Ile Ile His
 210 215 220
 Asp Lys Ile Gln Ala Val Lys Ser
 30 225 230

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 14 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKUELS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

Met Asp Thr Leu Gly Val Arg Trp Ser Lys Asn Ser Arg Val

5

10

5 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 15 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

10 (ii) ART DES MOLEKUELS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

Met Tyr Lys Ser Ser Gly Glu Cys Gly Arg Gly Leu Arg Arg Pro

5

10

15

15 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 13:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 16 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

20 (ii) ART DES MOLEKUELS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:

Met Ile Arg Tyr Ile Asp Glu Phe Gly Gln Thr Thr Thr Arg Met Gln

5

10

15

25 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 14:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 4 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

30 (ii) ART DES MOLEKUELS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:

Met Leu Tyr Leu

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 15:

35 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 6 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKUELS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 15:
Met Leu Leu Leu Tyr Leu

5

5 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 16:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 12 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

10 (ii) ART DES MOLEKUELS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 16:

Met Phe Gln Val Gln Gly Glu Val Trp Glu Val Phe

5

10

15 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 17:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 26 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

20 (ii) ART DES MOLEKUELS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 17:

Met Val Ile Ala Val Ser Cys Val Lys Leu Leu Ser Ala His Asn Ser

5

10

15

25 Thr Gln His Thr Ser Arg Lys His Lys Val

20

25

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 18:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

30 (A) LÄNGE: 49 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKUELS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 18:

35

Met Ser Glu Leu Thr His Ile Asn Cys Val Ala Leu Thr Ala Arg Phe

5

10

15

Pro Val Gly Lys Pro Val Val Pro Ala Ala Leu Met Asn Arg Pro Thr

20

25

30

Arg Gly Glu Arg Arg Phe Ala Tyr Trp Ala Leu Phe Arg Phe Leu Ala
35 40 45
His

5 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 19:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 4 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

10 (ii) ART DES MOLEKUELS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 19:

Met Leu Thr Leu

15 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 20:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 9 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

20 (ii) ART DES MOLEKUELS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 20:

Met Arg Leu Ser Lys Arg Ile Phe Thr

5

25 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 21:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 11 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

30 (ii) ART DES MOLEKUELS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 22:

Met Ser Lys Leu Gly Leu Thr Val Thr Asn Ala

5

10

35 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 23:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 88 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKUELS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 23:

```

Met Ile Pro Arg Asp Pro Arg Ser Pro Ala Pro Asp Leu Ser Ala Ile
                    5                      10                      15
5  Asn Gln Pro Ala Gly Arg Ala Glu Arg Arg Ser Gly Pro Ala Thr Leu
                    20                      25                      30
Ser Ala Ser Ile Gln Ser Ile Asn Cys Cys Arg Glu Ala Arg Val Ser
                    35                      40                      45
Ser Ser Pro Val Asn Ser Leu Arg Asn Val Val Ala Ile Ala Thr Gly
10                    50                      55                      60
Ile Val Val Ser Arg Ser Ser Phe Gly Met Ala Ser Phe Ser Ser Gly
65                    70                      75                      80
Ser Gln Arg Ser Arg Arg Val Thr
                    85

```

15

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 24:

(1) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 56 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

20

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKUELS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 24:

	Met	Leu	Cys	Lys	Lys	Ala	Val	Ser	Ser	Phe	Gly	Pro	Pro	Ile	Val	Val
25					5					10					15	
	Arg	Ser	Lys	Leu	Ala	Ala	Val	Leu	Ser	Leu	Met	Val	Met	Ala	Ala	Leu
				20					25					30		
	His	Asn	Ser	Leu	Thr	Val	Met	Pro	Ser	Val	Arg	Cys	Phe	Ser	Val	Thr
			35					40					45			
30	Gly	Glu	Tyr	Ser	Thr	Lys	Ser	Phe								
			50					55								

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 25:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

35

(A) LÄNGE: 49 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKUELS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 25:

[illegible]

10 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 26:

(1) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 6 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

15 (ii) ART DES MOLEKUELS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 26:

Met Pro Gln Lys Arg Glu

5

20 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 27:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 27 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

25 (ii) ART DES MOLEKUELS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 27:

Met Leu Asn Thr His Thr Leu Pro Phe Ser Ile Leu Leu Lys His Leu

5

10

15

Ser Gly Leu Leu Ser His Glu Arg Ile His Ile

30 20

25

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 28:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 5 Aminosäuren

35 (B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKUELS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 28:

Met Tyr Leu Glu Lys

5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 29:

5

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 26 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKUELS: Protein

10

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 29:

Met Thr Leu Thr Tyr Lys Asn Arg Arg Ile Thr Arg Pro Phe Arg Leu

5

10

15

Ala Arg Phe Gly Asp Asp Gly Glu Asn Leu

20

25

15

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 30:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 11 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

20

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKUELS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 30:

Met Gln Leu Pro Glu Thr Val Thr Ala Cys Leu

5

10

25

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 31:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 31 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

30

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKUELS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 31:

Met Pro Gly Ala Asp Lys Pro Val Arg Ala Arg Gln Arg Val Leu Ala

5

10

15

35

Gly Val Gly Ala Gly Leu Thr Met Arg His Gln Ser Arg Leu Tyr

20

25

30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:32:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 65 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

5

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKUELS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 32:

Met Arg Cys Glu Ile Pro His Arg Cys Val Arg Arg Lys Tyr Arg Ile

5

10

15

10

Arg Arg His Ser Pro Phe Arg Leu Arg Asn Cys Trp Glu Gly Arg Ser

20

25

30

Val Arg Ala Ser Ser Leu Leu Arg Gln Leu Ala Lys Gly Gly Cys Ala

35

40

45

Ala Arg Arg Leu Ser Trp Val Thr Pro Gly Phe Ser Gln Ser Arg Arg

15

45

50

55

Cys Lys Thr Thr Ala Ser

60

65

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)